

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ ⑫ Offenlegungsschrift
⑯ ⑯ DE 43 25 699 A 1

⑯ Int. Cl. 8:
C 12 N 15/62
C 12 N 5/16
C 12 Q 1/02
// C12N 15/56,15/12

DE 43 25 699 A 1

⑯ ⑯ Aktenzeichen: P 43 25 699.6
⑯ ⑯ Anmeldetag: 30. 7. 93
⑯ ⑯ Offenlegungstag: 2. 2. 95

⑯ ⑯ Anmelder:
Berns, Hartmut, 44627 Herne, DE

⑯ ⑯ Erfinder:
Berns, Hartmut, 44627 Herne, DE; Heumann, Rolf,
Prof. Dr., 44801 Bochum, DE

⑯ ⑯ Vertreter:
Herrmann-Trentepohl, W., Dipl.-Ing., 44623 Herne;
Kirschner, K., Dipl.-Phys.; Grosse, W., Dipl.-Ing.;
Bockhorni, J., Dipl.-Ing., 81476 München; Thiel, C.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat. Anwälte, 44623 Herne

⑯ ⑯ Rekombinantes DNA-Konstrukt

⑯ ⑯ Rekombiniertes, neuronalspezifisch aktivierte, transkri-
bierbares, lineares DNA-Konstrukt mit einem neuronalspezi-
fischen DNA-Kontrollelement zur Transcriptionsinitiation ei-
nes in 3'-Richtung stromabwärts befindlichen Strukturgens;
einem transkribierbaren, eukaryotischen Struktur-On-kogen,
das in 3'-Richtung stromabwärts zum neuronalspezifischen
DNA-Kontrollelement eingefügt ist, und ggf. einem in
3'-Richtung stromabwärts des Strukturgens eingefügten
Konstrukt, bestehend aus einem transkribierbaren Reporter-
gen, gekoppelt mit einem in 5'-Richtung stromaufwärts
eingefügten DNA Fragment, das für eine interne Riboso-
menbindungsstelle (IRES) kodiert.

DE 43 25 699 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 94 408 065/339

13/34

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein rekombiniertes DNA-Konstrukt und insbesondere ein neuronalspezifisch aktiviertes, transkribierbares DNA-Konstrukt, neuronale Zellen, die ein solches Konstrukt enthalten sowie die Verwendung dieses Konstrukts und solcher Zellen zum Testen von Wirkstoffen.

Die Herstellung eines rekombinierten, heterologen DNA-Fragments zur Einbringung in das Genom eines prokaryontischen und auch eukaryontischen Organismus unter Produktion von Transgenizität ist bekannt.

So beschreibt beispielsweise EP-OS 0 169 672 ein Verfahren zur Produktion eines transgenen, nichthumänen Säugetiers mit erhöhter Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Neoplasmen durch chromosomalische Einbringung einer aktivierten Onkogenesequenz in das Genom eines nichthumänen Säugetiers.

Die Erforschung von Nervenzellen war der Untersuchung mit DNA-Rekombinationsverfahren und anderen molekulargenetischen Verfahren bisher nur eingeschränkt zugänglich. So beschränkten sich die Untersuchungen auf nur wenige Typen neuronaler Zellen, die kultiviert werden konnten. Biologische Effekte, die man an kultivierten Zellen beobachtet, sind jedoch zu relativieren, da die Untersuchungsobjekte aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt würden und z. B. für Faktoren, die dort vom umliegenden Gewebe auf sie einwirken könnten, nicht mehr zugänglich sind. Somit besteht immer die Notwendigkeit, diese in vitro beobachteten Effekte in vivo zu verifizieren.

Das besondere Problem der Einbringung eines rekombinanten, ein Strukturen enthaltenden DNA-Fragments in das Genom eines eukaryotischen Organismus zur Untersuchung seiner Wirkung auf Nervenzellen besteht darin, daß die Expression des Proteinprodukts des Strukturgen möglichst spezifisch zu erfolgen hat, so daß hiervon nur Nervenzellen betroffen werden. Diese hochspezifische Kontrolle der Expression von DNA-Genprodukten in Nervenzellen war nach dem Stand der Technik bisher weder qualitativ noch quantitativ zufriedenstellend.

Ein weiteres Problem bei der Erforschung der Genexpression in Nervenzellen besteht darin, daß die Mechanismen der Genexpression im Nervensystem besonders komplex sind, da dieses aus vielen Unterarten von neuronalen Zellen besteht, die während ihrer Entwicklung und ihrer Differenzierung komplizierte Wechselwirkungen eingehen. Man vermutet dabei, daß Änderungen der Expressionsrate einiger neuronaler Gene mit der Informationsverarbeitung und -speicherung des Nervensystems zusammenhängen.

In neuronalen Zellen spielen die Ras-Proteine eine zentrale Rolle. Sie sind in der Lage Guanosintriphosphat (GTP) zu binden. Gebundenes GTP kann dann durch GTPase-Aktivitäten zu Guanosindiphosphat (GDP) und anorganischem Phosphat (P_i) hydrolysiert werden. GDP kann im Anschluß durch einen Austauschfaktor vom Ras-Protein getrennt und wieder gegen GTP ausgetauscht werden. Durch die intrazelluläre Feinabstimmung der GTPase-Aktivitäten und des Austauschfaktors wird das Verhältnis von Ras/GTP zu Ras/GDP in der Zelle exakt reguliert.

Ras/GTP kann als aktiviertes Ras im Gegensatz zu

z.B. Guanosindiphosphat (GDP) die Zelle weiterentwickeln. Ein aktiviertes Ras kann z.B. die Zelle so stimulieren, daß sie nicht normalerweise absterben würde, ein Überlebenssignal

(neurotrophes Signal) weiterleiten, das Neuronen am Absterben hindert. Dieses Überlebenssignal wird von außen an das Neuron durch neurotrophe Faktoren (z. B. NGF = Nerve Growth Faktor) herangetragen und über Thyrosinkinase-Rezeptoren durch die Zellmembran ins Zellinnere von neuronalen Zellen weitergeleitet. Hier stimuliert es den Austauschfaktor und erhöht damit der Ras/GTP-Anteil, wodurch das neurotrophe Signal weitergeleitet wird.

Insbesondere bei der Untersuchung des Einflusses von aktiviertem Ras-Protein auf Nervenzellen wurde nicht mit ras-DNA, sondern mit Ras-Protein gearbeitet, das von außen nur in einen Bruchteil der Neuronen einzubringen war. Bisher war es nicht möglich, eine Population von Neuronen zu erzeugen, die das aktive ras-Strukturen homogen in ihrem Genom integriert haben und dieses konstitutiv exprimieren.

Bei der Untersuchung der Wirkung von aktiviertem Ras-Protein auf verschiedene Zelltypen wurde ferner festgestellt, daß dieses zusammen mit anderen Induktoren viele nichtneuronale Zellen zur Transformation und damit zur unkontrollierten Proliferation anregen kann. Dies wäre bei stabiler genomischer ras-DNA-Integration für das heranwachsende Tier lethal, so daß die neuronale Spezifität der Ras-Expression für das Überleben eines transgenen Tieres, wie vorstehend erwähnt, essentiell ist.

Da exprimierte Ras-Proteine, wie vorstehend ange deutet, auch eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielen, wurde ihre Entstehung und insbesondere die sie exprimierenden ras-Gene intensiv untersucht. So wurde beispielsweise gefunden, daß der Austausch einer einzigen Base in den ras-Genen von Harvey-(v-Ha-ras) und Kirsten (v-Ki-ras)-Sarcoma-Virus zu einem Aminosäureaustausch im vom ras-Gen exprimierten Ras-Protein führt (D.J.Capon et al., Nature, Vol. 302, S. 33 – 37, (1983)). Die so mutierten Produkte führen schließlich zur Zelltransformation und damit zur unkontrollierten Proliferation dieser Zellen, wodurch sich die Tumorbildung manifestiert.

Zur Erforschung der Expressionsspezifität in Nervenzellen wurde das das ubiquitäre neuronale Protein Synapsin I kodierende Gen untersucht. Da regulatorische DNA-Sequenzen, die transkriptionale Kontrolle bewirken, oft in den 5'-flankierenden Regionen von Genen gefunden werden, wurden unter Verwendung von klonierter Synapsin I-cDNA (M.W. Kilimann und L.J. DeGennaro, EMBO J., Vol. 4, S. 1997 bis 2002 (1985)) 5'-flankierende Regionen der Synapsin I-Gene von Ratte und Mensch isoliert, deren Nukleotidsequenzen bestimmt, diese einer Restriktionsanalyse unterzogen und so der Ort des Transkriptionsstarts kartiert. Der so von A. Sauerwald et al. gefundene Synapsin I-Promotor (A. Sauerwald et al., J. Biol. Chem., Vol. 265, Nr. 25, S. 14932 – 14937 (1990)) ermöglicht eine rein neuronale Expression, die sämtliche anderen, verschiedenen Zelltypen eines Säugetieres ausschließt.

Es ist aus dem Stand der Technik bekannt, die Expressionsrate bzw. den Expressionsort von durch rekombinante Gene exprimierten Proteinen durch Kopplung des rekombinanten DNA-Fragments mit einem Reportergen zu bestimmen. Dabei wird das rekombinante DNA-Fragment mit dem Reportergen so kombiniert, daß dessen Produkt zusammen mit dem Produkt des rekombinanten DNA-Fragments k

o. d. R. die Zelle weiterentwickeln. Ein aktiviertes Ras kann z.B. die Zelle so stimulieren, daß sie nicht normalerweise absterben würde, ein Überlebenssignal

lung von zu untersuchendem Protein und dem Protein des Reportergens sichtbar macht. Beispielsweise lässt sich das für das prokaryontische Enzym β -Galaktosidase kodierende lacZ-Gen aus *E.coli* mit einem je nach Untersuchungsziel aufgebauten rekombinanten DNA-Fragment kombinieren. Bietet man dem exprimierten Enzym, das am Beginn der Metabolisierung vom Laktose steht, unter definierten Bedingungen ein bestimmtes synthetisches Farbstoffvorläufermolekül (X-Gal) an, so wird dieses zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Diese Blaufärbung zeigt also gleichzeitig die Expression des mit der β -Galaktosidase gekoppelten, zu untersuchenden Proteinproduktes des auf dem rekombinanten DNA-Fragment befindlichen Strukturgens an (A. Kalnins et al., EMBO J. Vol. 2, No. 4,593 (1983)). Durch die Koexistenz von Struktur- und Reportergen auf ein und demselben Transkript, ermöglicht durch die Ribosomenbindungsstelle, ist eine maximale Koexpression möglich.

Jedoch war es bisher nicht möglich, heterologe DNA herzustellen, in der ein beliebiges DNA-Strukturgebilde unter Kontrolle eines geeigneten Promotors neuronalspezifisch transkribiert und dessen Proteinprodukt in vivo konstitutiv exprimiert wird. Dabei wäre insbesondere die Kombination eines neuronalspezifischen Promotors mit einem Struktur-Onkogen nützlich, die bei der Erforschung des Mechanismus und der Beeinflussung neurodegenerativer Erkrankungen helfen könnte.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung ein neuronalspezifisch aktiviertes DNA-Konstrukt mit transkribierbarer Sequenz eines Strukturonkogens zur Einbringung in das Genom eines nichthumanen Säugetieres zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit einem DNA-Konstrukt gelöst, das ein neuronalspezifisches DNA-Kontrollelement zur Transkriptionsinitiation eines in 3'-Richtung stromabwärts befindlichen Strukturgens, ein transkribierbares, eukaryotisches Struktur-Onkogen, das in 3'-Richtung stromabwärts zum neuronalspezifischen DNA-Kontrollelement eingefügt ist, und ggf. ein in 3'-Richtung stromabwärts des Strukturgens eingefügtes Konstrukt, bestehend aus einem transkribierbaren Reportergen, gekoppelt mit einem in 5'-Richtung stromaufwärts eingefügten DNA-Fragment, das für eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) kodiert, aufweist.

Besonders bevorzugt weist dieses Konstrukt den Synapsin I-Promotors der Ratte (nachstehend als "synp" bezeichnet) als hochspezifisches Werkzeug zur rein neuronalen Expression eines unter seiner Kontrolle stehenden, in 3'-Richtung stromabwärts befindlichen DNA-Strukturgens, das komplett, genomische v-Ha-ras Strukturen des Menschen (nachstehend mit "ras" bezeichnet) in 3'-Richtung stromabwärts des synp-Promotors, ein Reportergen, vorzugsweise das bekannte lacZ-Gen, mit dem der Nachweis der Expression von aktiven Ras-Protein ermöglicht wird, wobei dem Reportergen in 5'-Richtung stromaufwärts ein Gen für die interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) vorgeschaltet ist, auf.

Es versteht sich, daß unter den erfindungsgemäß verwandten Begriffen Promotor, Kontrollelement, Struktur-Onkogen, Reportergen und DNA-Konstrukt und Fragment sowohl die vollständigen Sequenzen, wie sie

fragment of the *Pygmalion* by George Bernard Shaw. The title of the play is

vom ras-Strukturgen kodierte Ras-Protein durch die rein neuronale Kontrolle des synp-Promotors ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert werden. Ferner wird die vom lacZ-Gen kodierte β -Galaktosidase durch Einwirkung der IRES koexprimiert, so daß durch β -Galaktosidase-Aktivität und der damit verbundenen Farbreaktion diejenigen neuronalen Populationen, in denen aktives Ras-Protein exprimiert wird, identifiziert werden können.

10 Der synp-Promotor bietet also den Vorteil, die Wirkung eines beliebigen Proteins auf Nervenzellen zu untersuchen. Da die Expression des Proteins somit hochspezifisch nur in Nervenzellen durchgeführt wird, ist es möglich, eine Population von Neuronen zu erzeugen, 15 die homogen in ihrem Genom das aktive ras-Strukturen integriert haben und dieses konstitutiv exprimieren. Diese Expression geschieht unabhängig vom Typ der neuronalen Zellen, was nach dem Stand der Technik bisher unmöglich war.

20 Anstelle des synp-Promotors der Ratte können naturgemäß auch andere neuronalspezifische Promotoren oder Kontrollelemente verwandt werden, insbesondere auch synp-Promotoren des Menschen und andere Säugetiere, beispielsweise der Maus.

25 Das ras-Struktur-Onkogen kodiert für aktives Ras-Protein. Es enthält im 12. Triplettröhrchen gegenüber dem Wildtypgen eine G-T-Punktmutation, die auf Aminosäureebene einen Glycin-Valin-Austausch bedingt. Dies hat zur Folge, daß die Tertiärkonformation des Proteins bei den aktiven, GTP-gebundenen Form eingefroren wird, so daß GTP nicht mehr hydrolyzierbar ist und so permanent ein neurotropes Signal unabhängig von der Aktivierung des Austauschfaktors weitergeleitet wird.

Dies bietet erfindungsgemäß den Vorteil, daß neuro-
nale Populationen, deren neurotrophe Faktoren ihr
Überlebenssignal über Ras/GTP weiterleiten, somit von
diesen Faktoren unabhängig sind, wenn in ihnen aktives
Ras-Protein exprimiert wird. In diesen Populationen fin-
det demzufolge während des ontogenetischen Zeitrau-
mcs ihrer Abhängigkeit von neurotropen Faktoren
kein neuronaler Zelltod statt.

Alternativ können andere Onkogene verwandt werden, deren Proteine eine Rolle in neuronalen Zellen spielen. Insbesondere sind dies andere ras-Onkogene, wie N-ras oder Ki-ras in allen ihren Varianten sowie Naras in seinen von der Val 12-Variante abweichenden Varianten, beispielsweise mit einer Abweichung im 50. Triplet.

Durch die Integration des Konstruktes in das Genom der befruchteten Eizelle des werdenden Tieres ist gewährleistet, daß in sämtlichen Neuronen aller Populationen sowohl des zentralen, als auch des peripheren Nervensystems des erwachsenen Tieres das Konstrukt vorhanden ist und exprimiert wird, da es an die Genome aller Körperzellen mitotisch weitergegeben wird. Damit stehen im adulten Tier sämtliche neuronalen Subtypen zur Erforschung der Wirkung von aktivem Ras-Protein zur Verfügung.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die beobachteten Effekte durch das Einbringen in das Genom eines nichthumanen Säugetieres *in vivo* verifiziert werden können, so daß Ergebnisse erhalten werden, die für einen ganzheitlichen Organismus gültig sind, wodurch die Rekonstitution des erfundungsgemäßen DNA-Fragments

möglich ist, die Expression von Ras-Protein sowohl vom Ort als auch von ihrer Stärke abzuschätzen, in dem man sie mit der Signalintensität der durch das Reportermolekül ausgelösten Farbreaktion korreliert. Hierdurch wird wesentlich die Auswahl einer bestimmten transgenen Linie oder bestimmter neuronaler Strukturen mit erhöhter Überlebensfähigkeit, die man auf Ras-Effekte hin untersuchen will, erleichtert.

Die Erfindung wird durch die folgende eingehende Beschreibung mit Bezug auf die folgenden Figuren deutlicher.

Fig. 1 zeigt schematisch die Klonierungsstrategie zur Herstellung des erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts.

Fig. 2 zeigt maßstabgerecht den Anteil der DNA-Elemente am Gesamthaushalt einschließlich einer Eingangssequenz von 2,9 kpb. Die Eingangssequenz ist ohne Bedeutung für die Aktivität und Spezifität des Promoters an sich, kann aber einen Einfluß auf das Ausmaß der Aktivität haben.

Fig. 3 zeigt die DNA-Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Konstrukts.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird nun das Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen DNA-Fragmentes mit Bezug auf **Fig. 1** beschrieben.

Zur Herstellung wurden fünf verschiedene Vektoren benutzt:

1. pBluescript SK⁻ mit der Insertion des Synapsin 1-Promoters der Ratte in 5'-3'-Richtung zwischen den SalI- und BamH1-Stellen (ohne Synapsin-Startkodon) = SK⁻-syp (Dr. M. W. Kilimann, Inst. f. Physiol. Chemie, Ruhr-Universität Bochum, Deutschland).
2. pBluescript SK⁻ mit der Insertion des kompletten genomischen v-Ha-ras-Strukturgens des Menschen in der BamH1-Stelle = SK⁻-ras (R. Jaggi, Inselspital Bern, Schweiz).
3. pBluescript SK⁺ = SK⁺.
4. pBR322 (Fa. Stratagene, Heidelberg).
5. p1726, das das IRES des Encephalomyokarditisvirus und das hierzu richtig orientierte komplett lacZ-Strukturgens von E.coli enthält (J. Majors, Washington Univ. School of Medicine, St. Louis, Miss. USA).

Zur Erzeugung des in **Fig. 1** gezeigten Vektors 6 wurde der SK⁻-syp-Vektor mit der Restriktionsendonuklease BamH1 geschnitten und damit das Ende des Synapsinpromoters im 5'-nichttranslatierten Bereich geöffnet. Der SK⁻-ras-Vektor 2 wurde ebenfalls mit BamH1 geschnitten, wodurch das ras-Strukturgens von dem mit ihm verbundenen Vektor SK befreit wurde.

Das ras-Strukturgens wurde mit dem geöffneten SK⁻-syp-Vektor ligiert und die korrekte Orientierung des Strukturgens durch Sequenzierung des Überganges Promotor/Strukturgens verifiziert, wodurch sich Vektor SK⁻-syp-ras 6 ergab. Anschließend wurde Vektor 6 mit der Restriktionsendonuklease NotI verdaut, wodurch die meisten genomischen ras-Sequenzen in 3'-Richtung stromabwärts des Stoppkodons einschließlich der Polyadenylierungsstelle entfernt wurden. Der geöffnete Vektor (6) war somit bereit zur Aufnahme des IRES/lacZ-Fragments, dessen Enden zu den durch NotI generierten Schnittstellen kohäsig sein mußten. Die entstehende Sequenz ist in **Fig. 3** dargestellt.

5. **Integration des IRES/lacZ-Fragments in Vektor 6**

Die Integration des IRES/lacZ-Fragments in Vektor 6

6. **Zur Integration des IRES/lacZ-Fragments in Vektor 6**

(6) wurde folgende Klonierungsstrategie angewandt:

Das DNA-Plasmid p1726 5, das das IRES/lacZ-Fragment innerhalb zweier xbaI-Schnittstelle eingefügt besaß, wurde mit der Restriktionsendonuklease XbaI geschnitten, wodurch das IRES/lacZ-Fragment von mit ihm verbundenen Plasmidsequenzen befreit wurde. Das DNA-Plasmid pBluescriptSK⁺ wurde mit XbaI geöffnet und mit dem IRES/lacZ-Fragment ligiert. Die korrekte Orientierung von IRES in Nachbarschaft zu der bereits vorhandenen XmaIII-Schnittstelle wurde durch eine Restriktionsanalyse verifiziert. Um auf der anderen Seite des IRES/lacZ-Fragments eine weitere xmaIII-Schnittstelle zu erhalten, wurde das DNA-Plasmid pBR322 (Vektor 4 in **Fig. 1**) einem NruI/BamH1-Doppelverdau unterzogen und das entstandene, eine XmaIII-Schnittstelle enthaltende Fragment zwischen die Plasmidschnittstellen SmaI und BamH1 unter Erzeugung des Vektors 3 einligiert. Durch einen XmaIII-Verdau ließ sich auf diese Weise das IRES/lacZ-Fragment zurückgewinnen. Es wurde in den geöffneten Vektor 6 unter Erzeugung des in **Fig. 1** gezeigten Vektors 7 eingefügt, und die korrekte Orientierung von IRES in Nachbarschaft des ras-Strukturgens wurde durch eine Restriktionsanalyse verifiziert. Um die für die Injektion in Zygoten geeignete DNA zu erhalten, mußten vorher alle Vektorsequenzen entfernt werden. Dies ließ sich durch einen Verdau von Vektor 7 mit XbaI erreichen, durch den man das gebrauchsfertige linearisierte DNA-Konstrukt erhielt, das in **Fig. 2** komplett und in **Fig. 3** in seinen wesentlichen Bestandteilen dargestellt ist.

Die Einbringung dieses DNA-Fragmentes in das Genom eines nicht humanen Tieres geschah mit dem Fachmann bekannten Techniken.

Die Herstellung erfolgte nach Standardtechniken, wie sie im einzelnen von Brigid Hogan, Frank Costantini und Elizabeth Lacy in dem Laborhandbuch "Manipulating the Mouse Embryo", Cold Spring Harbor Laboratory, 1986, beschrieben werden:

- hormonelle Stimulation der Oozyten-Donoren zwecks Super- und Zwangsovulation;
- Befruchtung der Oozyten durch Zusammensetzen der Donoren mit Böcken;
- Entnahme der Zygoten nach Tötung der Donoren;
- Injektion der DNA-Lösung in einen der beiden Vorkerne einer Zygote;
- Zusammensetzen der Zygoten-Rezipienten mit vaskotomierten Böcken zur Identifikation empfängnisbereiter Tiere;
- Transfer der injizierten Zygoten in die Ampulla betäubter empfängnisbereiter Rezipienten;
- Zucht und Identifikation transgener Nachkommen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt in einem Test-Verfahren zur Bestimmung neuronaler Schädigung verwendet. Gemäß diesem Verfahren wird ein Säugetier, etwa eine Maus oder eine Ratte, in dessen Genom das erfindungsgemäße DNA-Fragment eingebracht wurde, der Wirkung einer Substanz mit Verdacht auf neuronenschädigende Wirkung ausgesetzt. Das Ausmaß der Schädigung bzw. Zerstörung der neuronalen Zellen in diesem Versuchstier wird mit dem Zustand

7. **Integration des IRES/lacZ-Fragments in Vektor 6**

8. **Zur Integration des IRES/lacZ-Fragments in Vektor 6**

9. **Zur Integration des IRES/lacZ-Fragments in Vektor 6**

auf neuronenschädigende Wirkung spezifisch und in viel kleineren Mengen als bisher prüfen zu können.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Herstellung neuronaler Zellkulturen ermöglicht, deren Zellen das erfindungsgemäße DNA-Fragment homogen enthalten. Es ist ein Vorteil dieses Verfahrens, mit dieser Zellkulturen die spezifische Wirkung des erfindungsgemäßen Strukturgens auf neuronale Zellen zu untersuchen. So können Versuche *in vitro* durchgeführt werden, die im Versuchstier nicht möglich wären oder durch die das Versuchstier unerwünschten Beeinträchtigungen ausgesetzt wäre.

Patentansprüche

15

1. Rekombiniertes, neuronalspezifisch aktiviertes, transkribierbares, lineares DNA-Kontrukt, gekennzeichnet durch:
ein neuronalspezifisches DNA-Kontrollelement zur Transcriptionsinitiation eines in 3'-Richtung 20 stromabwärts befindlichen Strukturgens;
ein transkribierbares, eukaryotisches Struktur-Onkogen, das in 3'-Richtung stromabwärts zum neuronalspezifischen DNA-Kontrollelement eingefügt ist, und ggf. ein in 3'-Richtung stromabwärts des Strukturgens eingefügtes Konstrukt, bestehend aus einem transkribierbaren Reporteren, gekoppelt mit einem in 5'-Richtung stromaufwärts eingefügten DNA-Fragment, das für eine optimale Ribosomenbindungsstelle (IRES) kodiert.
2. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das neuronalspezifische DNA-Kontrollelement ein Synapsin I-Promotor, insbesondere der Ratte ist.
3. DNA-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Struktur-Onkogen ein ras-Onkogen ist.
4. DNA-Konstrukt nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Struktur-Onkogen das komplette, genomische v-Ha-ras-Strukturgen des Menschen ist.
5. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reporteren für β-Galactosidase kodiert.
6. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung des DNA-Konstrukt Plasmide verwendet werden, ausgewählt aus pBluescriptSK⁻, pBluescriptSK⁺, pBR322 und p1726.
7. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in Zygoten eingebracht wird.
8. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in somatische 55 Zellen eingebracht wird.
9. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das vom Struktur-Onkogen kodierte aktive Protein im Genom des transgenen, nichthumanen Säugetiers konstitutiv exprimiert wird.
10. DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Produkt des

cion des Proteinproduktes des Reportergens Expressionseigenschaften des Struktur-Onkogens überprüft werden können.

12. Neuronale Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie das DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 11 enthält.
13. Verwendung des DNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder der Zelle nach Anspruch 12 zum Testen von Wirkstoffen auf neuronalspezifische Aktivität.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

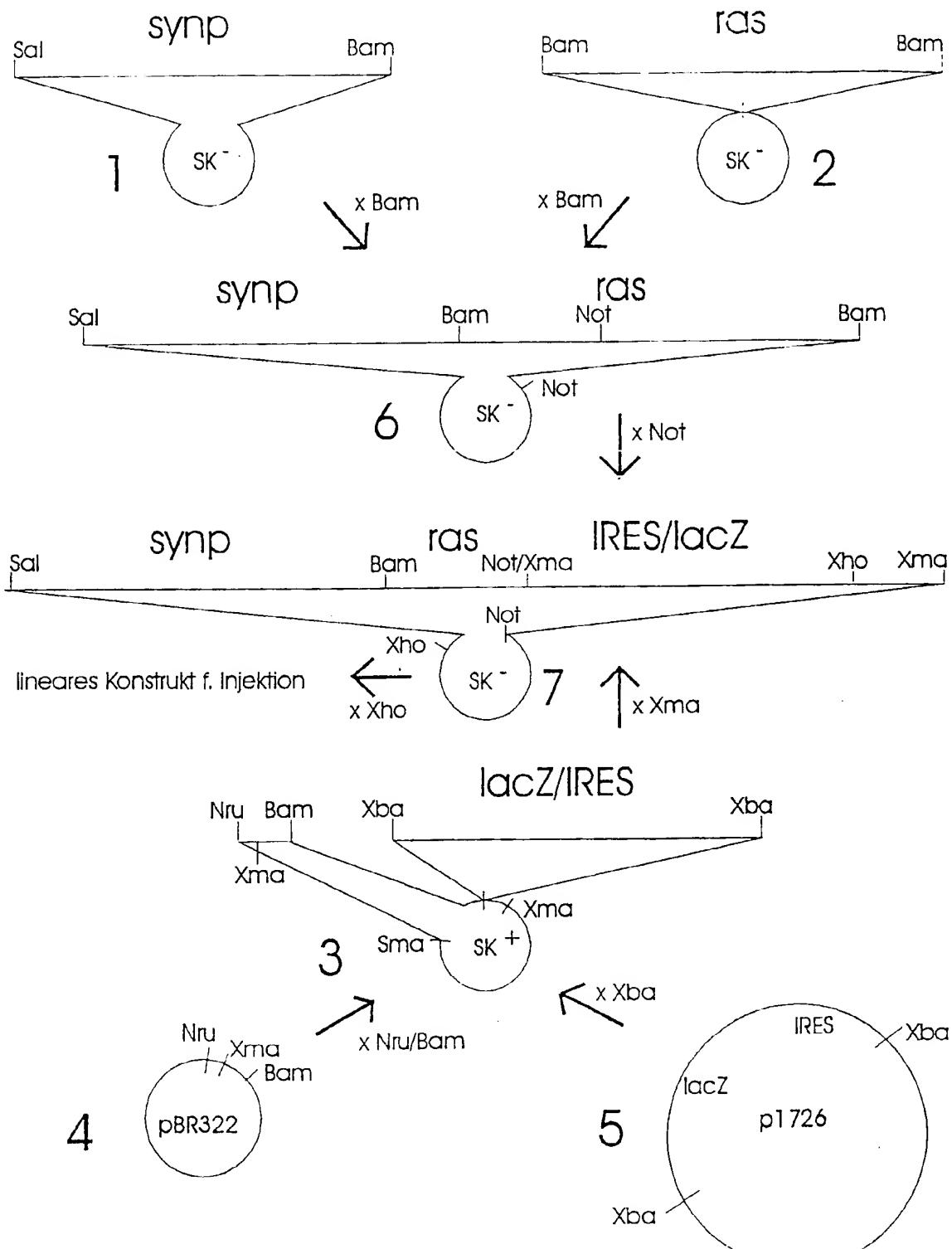


Fig. 1

lineares Konstrukt für Injektion

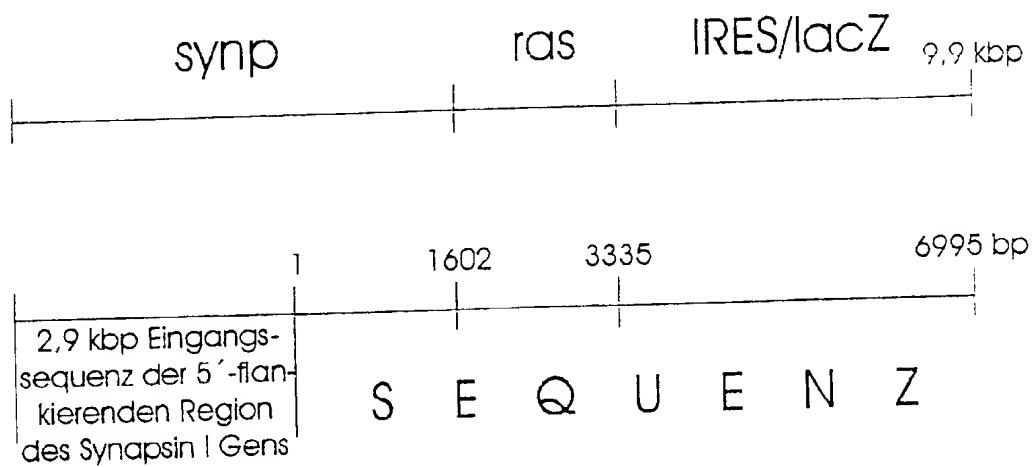


Fig. 2

Figur 3

1 ACCATCACCA AGGCAATTCT CATTAAAAAA AAAAACATTT AATTGGGGGC TTTCTTACAG
 TGGTAGTGGT TCCGTTAAGA GTAAATTCTT TTTTGTAAA TTAACCCCCG AAAGAATGTC
 Synapsin - Promotor ---->

61 TTTCAGAGAT GAGTCACTTA GCACCATGAT GGAGAATAIG GTGGCAGACCA CTGGCTTGAT
 AAAGTCTCTA CTCAGTGAAT CGTGGTACTA CCTCTTATAC CACCGTCTGT GACCGAAGTA

121 GCTGGAGACA TAGCTGAGAG CTGCATGCTG ATCCACAGGC AACACAGACA GACAGACAGA
 CGACCTCTGT ATCGACTCTC GACGTACGAC TAGGTGTCCG TTGTGTCTGT CTGTCTGTCT

181 CAGACAGACA GACAGACTGA CTGACTAACT GACTGACTCT GGGCTTGGCG TGGGTTTTG
 GTCTGTCTGT CTGTCTGACT GACTGATTGA CTGACTGAGA CCCGAACCGC ACCCAAAAC

241 AACCCCCAAA GCCCACCCCA TAGACATGCT TCCTCCAACA AGGTACACATA TCCTAACCTCT
 TTGGGGTTT CGGGTGGGT ATCTGTACGA AGGAGGTTGT TCCAGTGTAT AGGATTAGGA

301 TTTAACTCATT CCCAACAGTG CCACTCCCTT GTGACTAACG ATTCAAATAT ATGAACCTTC
 AAATTAGTAA GGGTTGTACG GGTGAGGGAA CACTGATTG TAAAGTTATA TACTTGGAAAG

361 TTATTCAGAC CACCAAAATT ACATTATTCT TTCATATATA TGTATTAAC TGCCTCCTGT
 AATAAGTCTG GTGGTTTAA TGTATAAGA AAGTATATAT ACATAATTGA CCGGAGGACA

421 CTGCAAAGTT CTTATACACG GAGGGAGACA TCTATGAACA CTGATTACAC TGGGTTTTGG
 GACGTTCAA GAATATGTGC CTCCCTCTGT AGATACTTGT GACTAATGTG ACCCAAAACC

481 CTACGTCCAG AGCAGAGGAA TGAGGGCATG TAGACTAAAT ATGTTGTGT GGAAGAGGCT
 GATGCAGGTC TCGTCTCCTT ACTCCCGTAC ATCTGATTAA TACAAGCACA CCTTCTCCGA

541 GAATACACAT CAGAGTTACT GCTGCAGGAA ATGCTTCTGC ATTGCATACC CAGAGTTCC
 CTTATGTGTA GTCTCAATGA CGACGTCTT TACGAAGACG TAACGTATGG GTCTCAAAGG

601 TTGCTCATCT GAGAGCATGT GTTTTTCCA GATGTGTGTA CTTGTGTGAG ATTCTCTGGG
 AACGAGTAGA CTCTCGTACA CAAAAAAGGT CTACACACAT GAACACACTC TAAGAGACCC

661 TGTGTGTCAA TGTGTTGCCT GAACGTGCAT TGCTCAATAT GTCATGTGT GTTACCTGG
 ACACACAGTT ACACAACGGA CTTGCACGTA ACGAGTTATA CGAGTACACA CAATGGGACC

721 GCTTGTACAT CTACATATAT ACCTGGATGC CCGTGTGTT TGTGATGTAC ATATACCTG
 CGAACATGTA GATGTATATA TGGACCTACG GGCACACAAG AACTACATG TATATGGGAC

781 TGTCATTCCT TGTTTTCTA TTTGTGTTAT TCCATGTGTT CCTTCAGGCT CTCACTACCC
 ACAGTAAGGA ACAAAAAGAT AAACACAATA AGGTACACAA GGAAGTCCGA GAGTGATGGG

841 AAGTGTCCAC CTCCGCCTGT CTGGTGATGT TTACGCTACC CCGTGCTCTT TTCTTGCCT
 TTCACAGGTG GAGGCGGACA GACCACTACA AATGCGATGG GGCACGAGAA AAGAAACGGA

Figur 3

961 TTATGTTCCC CTCCGAGTAT GCTTCTATCC CGACCCCTCAA CCCCCAAATG CCTTCAGAGG
 AATACAAGGG GAGGCTCATA CGAAGATAGG GCTGGGAGTT GGGGTTTTAC GGAAGTCTCC

1021 TGAAAATCAA CACTGGAAAC ACAAGTATCT GGGAAAGGGTA ACAATGCAAG TTAGCCTGAG
 ACTTTTAGTT GTGACCTTG TGTCATAGA CCCTTCCAT TGTTACGTTC AATCGGACTC

1081 GATTTAGGAG GAGGCTGAAA AACAGAGTAG GAGCCTTA CAGGGTCCAG ACCCTACGGA
 CTAATCCTC CTCCGACTT TTGTCTCATC CTCGGAATGA TGCCCAGGTC TGGATGCCT

1141 CAAGAACCCC CACTCCCACT CCCCCAAATTG CGCATTCCCT CCCCCATCAG AGGGGGAGGG
 GTTCTTGGGG GTGAGGGTGA GGGGTTAAC GCGTAAGGG A GGGGTAGTC TCCCCCTCCC

1201 GAAGAGGATG CAGCGCGGCG CGGCAGGTGC GCAGTGTGG ATTTAGTACC GCGGACAGAG
 CTTCTCCTAC GTCGCGCCGC GCCGCGCACG CGTGACAGCC TAAATCATGG CGCTGTCTC

1261 CCTTCGCCCC CGCTGCCGGC GCGCGCCACC ACCTCCCCAG CACCAAAGGC GGGCTGACGT
 GGAAGCGGGG GCGACGGCCG CGCGCGGTGG TGGAGGGGTC GTGGTTTCCG CCCGACTGCA

1321 CACTCTCCAG CCCTCCCCAA ACTCCCCTAC CTCACCGCCT TGGTCGCGTC CGTGCAGCGG
 GTGAGAGGTC GGGAGGGGTT TGAGGGGATG GAGTGGCGGA ACCAGCGCAG GCACGTGCC

1381 TGAGTCCAGT CGGGCCGCAC CACAAGAGGT GCAAGATAGG GGGGTGCAGG CGCGACCATA
 ACTCAGGTCA GCCCCGGCTG GTGTTCTCCA CGTTCTATCC CCCCACGTCC GCGCTGGTAT

1441 CGCTCTGCGG CGGCAGAGCC TCAGCGCTGC CTCAGTCTGC AGCGGGCAGC AGAGGAGTCG
 GCGAGACGCC GCCGTCTCGG AGTCGCGACG GAGTCAGACG TCGCCCGTCG TCTCCTCAGC

1501 CGTCGTGCCA GAGAGCGCCG CCGTGCTCCT GAGCCCCCTTG CGCTCCGCCA CCCCGGGCCCA
 GCAGCACGGT CTCTCGCGC GGCACGAGGA CTCGGGAAAC GCGAGGGGGG GGCGCCGGGT

1561 CCGACCCACT GCCCCTTGGA TCCGGGGCCG CATGAGGAGC GATGACGGAA TATAAGCTGG
 GGCTGGGTGA CGGGGAACCT AGGCCCCGGC GTACTCCTCG CTACTGCCTT ATATTCGACC
 ras - Strukturgen --

1621 TGGTGGTGGG CGCCGTCGGT GTGGGCAAGA GTGCGCTGAC CATCCAGCTG ATCCAGAAC
 ACCACCACCC GCGGCAGCCA CACCCGTTCT CACCGCAGCTG GTAGGTGAC TAGGTCTTGG
 ---->

1681 ATTTTGTGGA CGAATACGAC CCCACTATAG AGCTGAGCCT GGCGCCACCG TCCAGGTGCC
 TAAAACACCT GCTTATGCTG GGGTGTATAC TCCACTCGGA CGCGGGTGGC AGGTCCACGG

1741 AGCAGCTGCT GCGGGCGAGC CCAGGACACA GCCAGGATAG GGCTGGCTGC AGCCCCTGGT
 TCGTCGACGA CGCCCGCTCG GGTCTGTGT CGGTCTATC CCGACCGACG TCAGGGACCA

1801 CCCCTGCATG GTGCTGTGGC CCTGTCTCCT GCTTCCTCTA GAGGAGGGGA GTCCCTCGTC
 GGGGACGTAC CACGACACCG GGACAGAGGA CGAAGGGAGAT CTCCCTCCCT CAGGGAGCAG

Figur 3

1921 TGTGTGAAC TCCCCCACGG AAGGTCTGA GGGGGTCCCT GAGCCCTGTC CTCTGCAGG
 ACACACTTGA GGGGGTGCCT TTCCAGGACT CCCCCAGGGA CTCGGACAG GAGGACGTCC

1981 ATTCCTACCG GAAGCAGGTG GTCATTGATG GGGAGACGTG CCTGTTGGAC ATCCTGGATA
 TAAGGATGGC CTTCGTCCAC CAGTAACATAC CCCTCTGCAC GGACAACCTG TAGGACCTAT

2041 CCGCCGGCCA GGAGGAGTAC AGCGCCATGC GGGACCAGTA CATGCGCACC GGGGAGGGCT
 GCGGGCCGGT CCTCCTCATG TCGCGGTACG CCCTGGTCAT GTACGGTGG CCCCCTCCCAGA

2101 TCCTGTGTGT GTTTGCCATC ACAACACCA AGTCTTTGA GGACATCCAC CAGTACAGGT
 AGGACACACA CAAACGGTAG TTGTTGTGGT TCAGAAAAT CCTGTAGGTG GTCATGTCCA

2161 GAACCCCGTG AGGCTGGCCC GGGAGCCCAC GCCGCACAGG TGGGGCCAGG CCGGCTGCCGT
 CTTGGGCAC TCCGACCGGG CCCTCGGGTG CGCGGTGTCC ACCCCGGTCC GGCGACGCA

2221 CCAGGCAGGG GCCTCCTGTC CTCTCTGCGC ATGTCCTGGA TGCCGCTGCG CCTGCAGGCC
 GGTCCGTCCC CGGAGGACAG GAGAGACGCG TACAGGACCT ACGGCGACGC GGACGTCGGG

2281 CCGTAGGCCAG CTCTCGCTTT CCACCTCTCA GGGAGCAGAT CAAACGGGTG AAGGACTCGG
 GGCATCGGTC GAGAGCGAAA GGTGGAGAGT CCCTCGTCTA GTTTGCCAC TTCCTGAGCC

2341 ATGACGTGCC CATGGTGCTG GTGGGAACA AGTGTGACCT GGCTGCACGC ACTGTGGAAT
 TACTGCACGG GTACCACGAC CACCCCTTGT TCACACTGGA CCGACGTGCG TGACACCTTA

2401 CTCGGCAGGC TCAGGACCTC GCCCAGAACCT ACGGCATCCCT CTACATCGAG ACCTCGGCCA
 GAGCCGTCCC AGTCCTGGAG CGGGCTTCGA TGCCGTAGGG GATGTAGCTC TGGAGCCGGT

2461 AGACCCGGCA GGTGAGGCAG CTCTCCACCC CACAGCTAGC CAGGGACCCG CCCCAGCCCC
 TCTGGCCGT CCACTCCGTC GAGAGGTGGG GTGTCGATCG GTCCCTGGC GGGCGGGGGC

2521 CCCCAGGCCAG GGAGCAGCAC TCACTGACCC TCTCCCTTGA CACAGGGCAG CCGCTCTGGC
 GGGGTCGGTC CCTCGTCGTG AGTGAATGGG AGAGGAACT GTGTCCCGTC GGCGAGACCG

2581 TCTAGCTCCA GCTCCGGGAC CCTCTGGGAC CCCCCGGGAC CCATGTGACC CAGCGGGCCCC
 AGATCGAGGT CGAGGCCCTG GGAGACCCCTG GGGGGCCCTG GGTACACTGG GTGCCCGGGG

2641 TCGCGCTGTA AGTCTCCCGG GACGGCAGGG CAGTGAGGGA GCGGAGGGCC GGGGTCTGGG
 AGCGCGACAT TCAGAGGGCC CTGCGTCCTC GTCACCTCCCT CCGCTCCCGG CCCCAGACCC

2701 CTCACGCCCT GCAGTCCTGG GCCGACACAG CTCCGGGAA GGCGGAGGTC CTTGGGGAGA
 GAGTGCAGGGAA CGTCAGGACCC CGGCTGTGTC GAGGGCCCTG CCGCCTCCAG GAACCCCTCT

2761 GCTGCCCTGA GCCAGGCCGG AGCGGTGACC CTGGGGCCCG GCCCCTTTG TCCCCAGAGT
 CGACGGGACT CGGTCCGGCC TCGCCACTGG GACCCCGGGC CGGGGAGAAC AGGGGTCTCA

Figur 3

2881 CTGACTCGAG AGCTGGTGC AGGGTGGTCA AACCTGGCC AGACCTGGAG TTCAGGAGGG
 GACTCAGCTC TCGACCCACG TCCCACCAAGT TTGGGACCGG TCTGGACCTC AAGTCCTCCC

2941 CCCCGGGCCA CCCTGACCTT TGAGGGGCTG CTGTAGCATG ATGCGGGTGG CCCTGGGCAC
 GGGGCCCCGGT GGGACTGGAA ACTCCCCGAC GACATCGTAC TACGCCACC GGGACCCGTG

3001 TTCGAGATGG CCAGAGTCCA GCTTCCCGTG TGTGTGGTGG GCCTGGGAA GTGGCTGGTGC
 AAGCTCTACC GGTCTCAGGT CGAAGGGCAC ACACACCACC CGGACCCCTT CACCGACCAC

3061 GAGTCGGGAG CTTGGGCCA GGCAAGGCTT GATCCCACAG CAGGGAGCCC CTCACCCAGG
 CTCAGCCCTC GAAGCCCCGGT CCGTTCCGAA CTAGGGTGTGTC GTCCCTCGGG GAGTGGGTCC

3121 CAGGCAGGCA CAGGCCGGTC CCTCCTGATC CCATCCCTCC TTTCCCAGGG AGTGGAGGAT
 GTCCGCCGGT GTCCGGCCAG GGAGGACTAG GGTAGGGAGG AAAGGGTCCC TCACCTCCTA

3181 GCCTTCTACA CCTTGGTGCG TGAGATCGGG CAGCACAAAGC TGCGGAAGCT GAACCCTCCT
 CGGAAGATGT GCAACCACGC ACTCTAGGCC GTCGTGTTCG ACGCCTTCGA CTTGGGAGGA

3241 GATGAGAGTG GCCCGGGCTG CATGAGCTGC AAGTGTGTGC TCTCCTGACG CAGGTGAGGG
 CTACTCTCAC CGGGGCCGAC GTACTCGACG TTCACACACG AGAGGACTGC GTCCACTCCC
 Stopp

3301 GGACTCCCAG GGCAGCCGCT CTAGAGGAAT TCCGCCCTC TCCCTCCCCC CCCCCTAACG
 CCTGAGGGTC CGCCCGGCGA GATCTCCTA AGGCGGGGAG AGGGAGGGGG GGGGATTGC
 Internal Ribosomal Entry

3361 TTACTGGCCG AAGCCGCTTG GAATAAGGCC GGTGTGCGTT TGTCTATATG TTATTTCCA
 AATGACCGGC TTCGGCGAAC CTTATTCCGG CCACACGCAA ACAGATATAC AATAAAAGGT
 Site --->

3421 CCATATTGCC GTCTTTGGC AATGTGAGGG CCCGAAACC TGGCCCTGTC TTCTTGACGA
 GGTATAACCG CAGAAAACCG TTACACTCCC GGGCCTTTGG ACCGGGACAG AAGAACTGCT

3481 GCATTCTAG GGGCTTTCC CCTCTCGCCA AAGGAATGCA AGGTCTGTTG AATGTCTGTA
 CGTAAGGATC CCCAGAAAGG GGAGAGCGGT TTCCCTTACGT TCCAGACAAAC TTACAGCACT

3541 AGGAAGCACT TCCTCTGGAA GCTTCTGAA GACAAACAAC GTCTGTAGCG ACCCTTGCA
 TCCTCTGTCAGGACACTT CGAAGAACCTT CTGTTGTTG CAGACATCGC TGGAAACGTT

3601 GGCAGCGGAA CCCCCCACCT GGCGACAGGT GCCTCTGCGG CCAAAAGCCA CGTGTATAAG
 CCGTCGCCTT GGGGGTGGC CCGCTGTCCA CGGAGACGCC GGTTTCGGT GCACATATTC

3661 ATACACCTGC AAAGGCAGCA CAACCCAGT GCCACGTTGT GAGTTGGATA GTTGTGGAAA
 TATGTGGACG TTTCCGCCGT GTTGGGGTCA CGGTGCAACA CTCAACCTAT CAACACCTTT

3721 GAGTCAAATG GCTCTCTCA AGCGTATTCA ACAAGGGCT GAAGGATGCC CAGAAGGTAC
 CTCAGTTAC CGAGAGGAGT TCGCATAAGT TGTTCCCCGA CTTCCTACGG GTCTTCCATG

Figur 3

3841 GGTTAAAAAA CGTCTAGGCC CCCCCAACCA CGGGGACGTG GTTTTCCITT GAAAAACACG
 CCAATTTTT GCAGATCCGG GGGGCTTGGT GCCCTGCAC CAAAAGGAAA CTTTTGTGC

3901 ATGATAAGCT TGCCACAACC ATGATTACGG ATTCACTGGC CGTCGTTTA CAACGTCGTG
 TACTATTGCA ACGGTGTTGG TACTAATGCC TAAGTGACCG GCAGCAAAAT GTGAGCAC
 lacZ - Strukturgen --->

3961 ACTGGGAAAAA CCCTGGCGTT ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTCGCCA
 TGACCCTTT GGGACCGCAA TGGGTTGAAT TAGCGGAACG TCGTGTAGGG GGAAAGCGGT

4021 GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA
 CGACCGCATT ATCGCTTCTC CGGGCGTGGC TAGCGGAAG GGTTGTCAAC GCGTCGGACT

4081 ATGGCGAATG GCGCTTGCC TGGTTTCCGG CACCAGAACG GGTGCCGGAA AGCTGGCTGG
 TACCGCTTAC CGCGAACCGG ACCAAAGGCC GTGGTCTTCG CCACGGCCTT TCGACCGACC

4141 AGTGCATCT TCCTGAGGCC GATACTGTG TCGTCCCTC AAAACTGGCAG ATGCACGGTT
 TCACGCTAGA AGGACTCCGG CTATGACAGC AGCAGGGGAG TTTGACCGTC TACGTGCCAA

4201 ACGATGCGCC CATCTACACC AACGTAACCT ATCCCATTAC GGTCAATCCG CCGTTGTTC
 TGCTACGCGG GTAGATGTGG TTGCATTGGA TAGGGTAATG CCAGTTAGGC GGCAAACAAG

4261 CCACGGAGAA TCCGACGGGT TGTTACTCGC TCACATTTAA TGTTGATGAA AGCTGGCTAC
 GGTGCCTTT AGGCTGCCA ACAATGAGCG AGTGTAAATT ACAACTACTT TCGACCGATG

4321 AGGAAGGCCA GACCGAATT ATTTTTGATG GCGTTAACTC GGCCTTCAT CTGTGGTGCA
 TCCTTCCGGT CTGCGCTTAA TAAAAACTAC CGCAATTGAG CCGCAAAGTA GACACCACGT

4381 ACAGGGCGCTG GGTGGTTAC GGCCAGGACA GTCTGGGCC GTCTGAATT GACCTGAGCG
 TGCCCGCGAC CCAGCCAATG CCGGTCTGT CAGCAAACGG CAGACTAAA CTGGACTCGC

4441 CATTGGTACG CGCCGGAGAA AACCGCCTCG CGGTGATGGT GCTGCGTTGG AGTGACGGCA
 GTAAAAATGC GCGGCCTTT TTGGCGGAGC GCCACTACCA CGACGCAACC TCACTGCCGT

4501 GTTATCTGGA AGATCAGGAT ATGTGGCGGA TGAGCGGCAT TTTCCGTGAC GTCTCGTTGC
 CAATAGACCT TCTAGTCCTA TACACCGCCT ACTCGCCGTA AAAGGCACTG CAGAGCAACG

4561 TGCATAAACCC GACTACACAA ATCAGCGATT TCCATGTTGC CACTCGCTT AATGATGATT
 ACGTATTTGG CTGATGTGTT TAGTCGCTAA AGGTACAACG GTGAGCGAAA TTACTACTAA

4621 TCAGCCGCGC TGTACTGGAG GCTGAAGTTC AGATGTGCGG CGAGTTGCGT GACTACCTAC
 AGTCGGCGCG ACATGACCTC CGACTTCAAG TCTACACGCC GCTCAACGCA CTGATGGATG

4681 GGGTAACAGT TTCTTATGG CAGGGTGAAA CGCAGGTGCG CAGCGGCACC GCGCCTTTCG
 CCCATTGTCA AAGAAATACC GTCCCACTTT CGTCCAGCG GTCGCCGTGG CGCGGAAAGC

Figur 3

4801 TCGAAAACCC GAAACTGTGG AGCGCCGAAA TCCCCAATCT CTATCGTGC G TG GT TT GAA C
AGCTTTGGG CTTTGACACC TCGCGGCTT AGGGCTAGA GATAGCACGC CACCAACTTG

4861 TGCACACCGC CGACGGCACG CTGATTGAAG CAGAAGCCTG CGATGTCGGT TTCCCGAGG
ACGTGTGGCG GCTGCCGTGC GACTAACTTC GTCTCGGAC GCTACAGCCA AAGGCGCTCC

4921 TGC GGATTGA AAATGGTCTG CTGCTGCTGA ACGGCAAGCC GTTGCTGATT CGAGGCGTTA
ACGCCTAACT TTTACCAGAC GACGACGACT TGCCGTTCGG CAACGACTAA GCTCCGCAAT

4981 ACCGTCACGA GCATCATCCT CTGCATGGTC AGGTCA TGGGA TGAGCAGACG ATGGTGCAGG
TGGCAGTGCT CGTAGTAGGA GACGTACCA G TCCAGTACCT ACTCGTCTGC TACCA CGTCC

5041 ATATCCTGCT GATGAAGCAG AACAACTTTA ACGCCGTGC CTGTTCGCAT TATCCGAACC
TATAGGACGA CTACTTCGTC TTGTTGAAAT TGCCGACGC GACAAGCGTA ATAGGCTTGG

5101 ATCCGCTGTG CTACACGCTG TGCGACCCCT ACGGCCTGTA TGTGGTGGAT GAAGCCAATA
TAGCCGACAC CATGTGCGAC ACGCTGGCGA TGCCGGACAT ACACCACCTA CTTCGGTTAT

5161 TTGAAACCCA CGGCATGGTG CCAATGAATC GTCTGACCGA TGATCCGCGC TGGCTACCGG
AACTTTGGGT GCCGTACCAAC GGTTACTTAG CAGACTGGCT ACTAGGCGCG ACCGATGGCC

5221 CGATGAGCGA ACGCGTAACG CGAATGGTGC AGCGCGATCG TAATCACCCG AGTGTGATCA
GCTACTCGCT TGCGCATTGC GCTTACCA CG TCGCGCTAGC ATTAGTGGGC TCACACTAGT

5281 TCTGGTCGCT GGGGAATGAA TCAGGCCACG GCGCTAATCA CGACGCGCTG TATCGCTGG
AGACCAGCGA CCCCTTACTT AGTCCGGTGC CGCGATTAGT GCTGCGCGAC ATAGCGACCT

5341 TCAAATCTGT CGATCCTTCC CGCCCGGTGC AGTATGAAGG CGGCGGAGCC GACACCACGG
AGTTTAGACA GCTAGGAAGG GCGGGCCACG TCATACTTCC GCGCCTCGG CTGTGGTGC

5401 CCACCGATAT TATTGCCCCG ATGTACGCGC GCGTGGATGA AGACCAGCCC TTCCCGGCTG
GGTGGCTATA ATAAACGGGC TACATGCCGC CGCACCTACT TCTGGTGGGG AAGGGCCGAC

5461 TGCCGAAATG GTCCATCAAA AAATGGCTTT CGCTACCTGG AGAGACGCGC CCGCTGATCC
ACGGCTTAC CAGGTAGTTT TTTACCGAAA GCGATGGACC TCTCTGGCG GGC GACTAGG

5521 TTTGCGAATA CGCCCACGCG ATGGGTAACA GTCTTGGCGG TTTGCTAAA TACTGGCAGG
AAACGCTTAT GCGGGTGC GCGC TACCCATTGT CAGAACCGCC AAAGCGATTG ATGACCGTCC

5581 CGTTTCGTCA GTATCCCCGT TTACAGGGCG GCTCGTCTG GGACTGGGTG GATCAGTCGC
GCAAAGCAGT CATAGGGGCA AATGTCCCGC CGAACGACAC CCTGACCCAC CTAGTCAGCG

5641 TGATTAATA TGATGAAAAC GGCAACCCGT GGTCGGCTTA CGGC GG TGAT TTTGGCGATA
ACTAATTAT ACTACTTTG CCGTTGGCGA CCAGCCGAAT GCGCCACTA AAACCGCTAT

Figur 3

5761 CAGCGCTGAC GGAAGCAAAA CACCAGCAGC AGTTTTCCA GTTCCGTTA TCCGGGCAAA
 GTCGCGACTG CCTTCGTTT GTGGTCGTCG TCAAAAAGGT CAAGGCAAAT AGGCCCCTTT

5821 CCATCGAACT GACCAGCGAA TACCTGTTCC GTCATAGCGA TAACGAGCTC CTGCACTGGA
 GGTAGCTTCA CTGGTCGTT ATGGACAAGG CAGTATCGCT ATTGCTCGAG GACGTGACCT

5881 TGGTGGCGCT GGATGGTAAG CCGCTGGCAA GCGGTGAAGT CCCTCTGGAT GTCGCTCCAC
 ACCACCGCGA CCTACCATTG GGCAGCGTT CGCCACTTCA CGGAGACCTA CAGCGAGGTG

5941 AAGGTAAACA GTTGATTGAA CTGCCTGAAC TACCGCAGCC GGAGAGCGCC GGGCAACTCT
 TTCCATTGTT CAACTAACTT GACGGACTTG ATGGCGTCGG CCTCTCGCGG CCCGTTGAGA

6001 GGCTCACAGT ACGCGTAGTG CAACCGAACG CGACCGCATG GTCAGAAGCC GGGCACATCA
 CCGAGTGTCA TGCGCATCAC GTTGGCTTGC GCTGGCGTAC CAGTCTTCGG CCCGTGTAGT

6061 GCCCCTGGCA GCAGTGGCGT CTGGCGAAA ACCTCAGTGT GACGCTCCCC GCCGGTCCCC
 CGCGGACCGT CGTCACCGCA GACCGCCTTT TGGAGTCACA CTGCGAGGGG CGGCGCAGGG

6121 ACGCCATCCC GCATCTGACC ACCAGCGAAA TGGATTTTG CATCGAGCTG GGTAATAAGC
 TGCAGTAGGG CGTAGACTGG TGGTCGCTTT ACCTAAAAC GTAGCTCGAC CCATTATTG

6181 GTTGGCAATT TAACCGCCAG TCAGGCTTTC TTTCACAGAT GTGGATTGGC GATAAAAAC
 CAACCGTTAA ATTGGCGGTG AGTCCGAAAG AAAGTGTCTA CACCTAACCG CTATTTTTG

6241 AAC TGCTGAC GCCGCTGCCG GATCAGTTCA CCCGTCGACC GCTGGATAAC GACATTGGCG
 TTGACGACTG CGGCGACGCG CTAGTCAAGT GGGCACGTGG CGACCTATTG CTGTAACCGC

6301 TAAGTGAAGC GACCCGCATT GACCCTAACG CCTGGGTGCA ACGCTGGAAG GCGGCGGGCC
 ATTCACTTCG CTGGCGTAA CTGGGATTGC GGACCCAGCT TGCGACCTTC CGCCGCCCGG

6361 ATTACCAAGGC CGAACGAGCG TTGTTGCAGT GCACGGCAGA TACACTTGCT GATGGGTGC
 TAATGGTCCG GCTTCGTCGC AACAACGTCA CGTGCCTCT ATGTGAACGA CTACGCCACG

6421 TGATTACGAC CGCTCACCGCG TGGCAGCAGTC AGGGGAAAAC CTTATTTATC AGCCGGAAA
 ACTAATGCTG GCGAGTGCAG ACCGTCGTAG TCCCCTTTG GAATAATAG TCGGCCTTT

6481 CCTACCGGAT TGATGGTAGT GGTCAAATGG CGATTACCGT TGATGTTGAA GTGGCGAGCG
 GGATGGCTA ACTACCACCA CCAGTTTACG GCTAATGGCA ACTACAACCTT CACCGCTCGC

6541 ATACACCGCA TCCGGCGCGG ATTGGCCTGA ACTGCCAGCT GGCGCAGGTA GCAGAGCGGG
 TATGTGGCGT AGGCCGCGCC TAACCGGACT TGACGGTCGA CGCGCTCCAT CGTCTCGCC

6601 TAAACTGGCT CGGATTAGGG CCGCAAGAAA ACTATCCGA CGCCTTACT GCCGCCTGTT
 ATTTGACCGA GCCTAATCCC GGCGTTCTT TGATAGGGCT GGCGGAATGA CGGCGGACAA

Figur 3

6721 ACGGTCTGCG CTGCGGGACG CGCGAATTGA ATTATGGCCC ACACCAGTGG CGCGGGCGACT
TGCCAGACGC GACGCCCTGC CGCCTTAACT TAATACCGGG TGTGGTCACC GCGCCGCTGA

6781 TCCAGTTCAA CATCAGCCGC TACAGTCAAC ACCIACGTAT CGAAACCAAGC CATCGCCATC
AGGTCAAGTT GTAGTCGGCG ATGTCAGTTG TCGTTGACTA CCTTTGGTCG GTAGCGGTAG

6841 TGCTGCACGC GGAAGAAGGC ACATGGCTGA ATATCGACGG TTTCCATATG GGGATTGGTG
ACGACGTGCG CCTTCTTCCG TGTACCGACT TATAGCTGCC AAAGGTATAC CCCTAACAC

6901 GCGACGACTC CTGGAGCCCG TCAGTATCGG CGGAATTCCA GCTGAGCGCC GGTGCTACC
CGCTGCTGAG GACCTCGGGC AGTCATAGCC GCCTTAAGGT CGACTCGCGG CCAGCGATGG

6961 ATTACCAGTT GGTCTGGTGT CAAAAATAAT AATAA
TAATGGTCAA CCAGACCACA GTTTTTATTA TTATT
Stopp